

- strategy in cancer treatment[J]. JK Sci, 2005,1(7):1-3
- 2 Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V, *et al.* Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2008, 11(1): 1-15
- 3 Bertucci F, Finetti P, Cervera N. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers [J]. Oncogene, 2006, 25(6):2273-2284
- 4 Drost J, Agami R. Transformation locked in a loop[J]. Cell, 2009, 139(4): 654-656
- 5 Tsuchida R, Das B, Yeger H, *et al.* Cisplatin treatment increases survival and expansion of a highly tumorigenic side - population fraction by upregulating VEGF/Flt1 autocrine signaling [J]. Oncogene, 2008,27(28):3923-3934
- 6 姚昶,杨理,陈运,等. 芪黄煎剂干预胆囊术后创面炎症反应促进修复的临床研究[J]. 中国临床医药研究杂志,2010,6(38):10-14
- 7 Ribatti D. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2008, 270(8):181-224
- 8 唐昱,盛国太,钟志英. 丹红注射液促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2010,8(3):3110-3111
- 9 黎思毅,彭红娟. 乳腺癌组织氧化应激反应指标的变化[J]. 实用医学杂志,2009,25(16):2626-2627
- 10 Lopez-lozaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy [J]. Cancer Lett, 2007,252(1):1-8
- 11 Pawlak K, Pawlak D, Myliwiec M. Possible association between circulating vascular endothelial growth factor and oxidative stress markers in hemodialysis patients[J]. Med sci Monit, 2006,12(4):181-185
- 12 易静,杨洁. 活性氧调控蛋白质修饰影响肿瘤细胞行为机制的研究进展[J]. 上海交通大学学报,2012,32(9):1122-1127
- 13 Singh G, Maulik S, Jaiswal A, *et al.* Effect on antioxidant levels in patients of breast carcinoma during neoadjuvant chemotherapy and mastectomy[J]. Malays J Med Sci. 2010,17(2):24-28
- 14 赵正,吴丽君. 黄芪提取物对大鼠氧自由基的影响[J]. 长治医学院学报,2012,26(2):87-90
- 15 黄云峰,李连锬,谢早红,等. 黄芪注射液对 H22 荷瘤小鼠抗肿瘤作用机制[J]. 武警医学,2011,22(7):562-564
- (收稿日期:2013-07-03)
(修回日期:2013-07-18)

小鼠模型疫苗 HBV S - ecdCD40L 表达载体的构建及其融合蛋白生物活性预测

徐 英 吴金明 吴文治 蓝松松 吴乐灿

摘 要 **目的** 制备小鼠模型疫苗 HBV S - ecdCD40L 融合基因表达载体并采用软件预测其所表达蛋白的合理性及生物活性。**方法** 首先从质粒中扩增 HBV S 基因,从小鼠淋巴细胞中扩增 CD40L 胞外段(extracellular domain, ECD)基因。然后通过 RT-PCR 法将其串联并与载体相连接,完成构建后采用软件分析其所表达蛋白是否与预期一致。**结果** 构建小鼠模型表达载体并通过软件分析 HBV S、ecdCD40L 两个基因连接之后其蛋白的疏水性和亲水性无改变,也没有出现新的表位。连接链(linker)不影响融合蛋白的二级结构。**结论** 该载体的设计符合预期,其表达的融合蛋白保留了 HBV S 和小鼠 CD40L 胞外段的生物学活性,为进一步研究奠定了基础。

关键词 乙型肝炎病毒表面抗原 S 基因 小鼠 CD40 - 配体胞外段 生物活性预测

Construction of Murine HBV S - ecdCD40L Expression Vector and Prediction of Its Biological Activity. Xu Ying, Wu Jinming, Wu Wenzhi, Lan songsong, Wu Lecan. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To construct murine HBV S - ecdCD40L expression vector by biotechnology and forecast the biological activity of HBV S - ecdCD40L fusion protein. **Methods** First HBV S gene was amplified from plasmid and mouse ecdCD40L from lymphocytes, then HBV S genes was fused and murine ecdCD40L genes in RT-PCR and expression vector was constructed. Whether the expressed proteins in line with expectations was analyzed by software. **Results** The expression vector was constructed successfully. The hydrophobic and hydrophilic of fusion protein was the same and fusion protein secondary structure level had no new epitope. The linker did

基金项目:温州市科技局基金资助项目(Y20100204)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院消化内科

通讯作者:吴金明,博士,教授,主任医师,电子信箱:phdww0003@aliyun.com

not influence the secondary structure of the protein. **Conclusion** The design of the fusion protein is appropriate. It keeps the biological activities of HBV S and murine ecdCD40L.

Key words HBV S; ecdCD40 ligand; Biological activity prediction

乙型肝炎病毒简称乙肝病毒,是一种 DNA 病毒,属于嗜肝 DNA 病毒科。乙肝病毒性肝炎是世界范围内广泛传播的传染病,一般可分为急性和慢性感染。全世界约有 4 亿人是慢性乙肝患者并且有很大的风险将发展成肝硬化、肝细胞癌等疾病^[1]。目前尽管有很多有效的抗病毒药物来治疗慢乙肝,但是很少得到持续的病毒学应答,加上这些药物的不良反应,因此现在急需寻找治疗乙肝的新途径。很多研究表明控制 HBV 感染有赖于机体的免疫系统^[2]。本研究之前针对人的疫苗,在转染树突状细胞中获得成功^[3]。通过疫苗激活树突状细胞表面的 CD40 分子,提高细胞分泌白介素 12 的能力及细胞表面免疫调节分子 (HLA-DR, CD80, CD86) 的表达,提高同种异体 T 细胞的增殖能力。为进一步研究该类型疫苗对控制和清除乙肝病毒的疗效及安全性,我们合成针对小鼠模型的疫苗,为以后的动物实验做准备。

材料与方法

1. 材料: PCR 引物序列合成及质粒测序由上海捷瑞生物有限公司完成。小鼠 CD40L 胞外段基因序列 (GeneBank 编号 NM_011616), 连接链 (linker) 核苷酸序列为 ggcgcgcgcgcg, pcDNA3.1 (+) 质粒、PCP10 质粒、ayw 亚型 HBV S 基因序列由本室保存 (GeneBank 编号 AF280817)^[3]。

2. 小鼠 HBV S-eecdCD40L 表达载体的构建: 首先扩增 HBV S 基因序列: 以 PCP10 质粒为模板, 加入引物: 5'-GCGGGTACCATGGAGAACATCACATCAGGATTC-3', 含 Kpn I 酶切位点; 5'-GGAGAATTCGCGCGCGCGGCC AATGTAT-ACCCAAAGACAAAAGAAAAT-3', 含 EcoR I 酶切位点以及连接链序列, 扩增 S 基因片段。其次扩增小鼠 ecdCD40L 基因序列: (1) 取小鼠外周血, 与 PBS 液 1:1 混合后, 将淋巴细胞分离液轻轻覆盖于表面, 离心取白色云雾层, 即为淋巴细胞层。(2) RNAiso Reagent 分离得到淋巴细胞总 RNA, 采用 RT-PCR 试剂盒, 加入引物: 5'-TTAGAATTCCTTCAT-AGAAGATTGGATAAGGTCGAA-3', 含 EcoR I 酶切位点; 5'-GCGCTCGAGTTAGAGTTTGAGTAAGCCAAAAGA-3', 含 Xho I 酶切位点, 扩增小鼠 ecdCD40L。然后将 HBV S 基因与 ecdCD40L 基因经 EcoR I 酶切后由连接酶连接, 扩增得到 HBV S-eecdCD40L 融合基因。将该基因与 pcDNA3.1 (+) 通过 Kpn I 和 Xho I 双酶切及连接酶连接成 pcDNA3.1-S-eecdCD40L 表达载体。

3. pcDNA3.1-S-eecdCD40L 表达载体软件分析: 采用 DNASTar 软件中的 Protean 程序分析融合蛋白的理化性质、抗

原性以及表位。用 www.expasy.org 网站提供的 Protscale 方案及 HNN 方案分析融合蛋白的柔性及二级结构。

结 果

1. 成功构建小鼠模型 pcDNA3.1-S-eecdCD40L 表达载体: 经 EcoR I 单酶切及 Kpn I 和 Xho I 双酶切鉴定, 电泳结果分别为 7000bp 左右大小的 pcDNA3.1-S-eecdCD40L 表达载体及 1500bp 左右的 HBV S-eecdCD40L 融合基因和 5000bp 左右的 pcDNA3.1 载体基因 (图 1)。

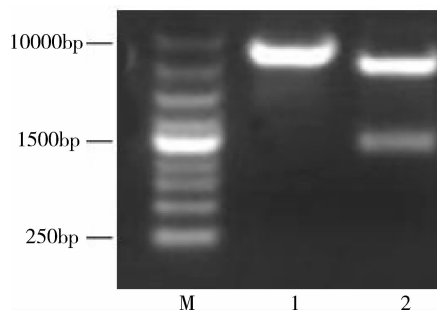


图 1 电泳图

1. pcDNA3.1-S-eecdCD40L 经 EcoR I 单酶切电泳图; 2. pcDNA3.1-S-eecdCD40L 经 Kpn I 和 Xho I 双酶切电泳图; M. marker

2. 融合蛋白 pcDNA3.1-S-eecdCD40L 的理化性质分析结果: 通过软件分析可知该载体所表达的蛋白分子式为 $C_{2275}H_{3502}N_{580}O_{629}S_{28}$, 分子质量为 49940.0 Da。通过 Protean 软件分析可知与 HBV S 基因、ecdCD40L 基因单独表达所得蛋白的亲水性和疏水性相比较, HBV S、ecdCD40L 两个基因串联之后融合蛋白的亲水性和疏水性未受影响, linker 部位抗原性低, 两侧 HBV S 及 ecdCD40L 氨基酸序列的抗原性未发生改变, 且没有新的表位出现, linker 所在部位即 227~230 位氨基酸表位值低 (图 2)。

3. 柔性分析结果: 经分析 227~230 位氨基酸 (linker 所在部位) 存在高柔性区, 连接链两侧的柔性区与未连接相比没有发生改变 (图 3)。

4. HBV S-eecdCD40L 融合蛋白的二级结构预测结果: 提示 linker 所在部位为无规卷曲, 不影响两侧 HBV S 和 ecdCD40L 结构。

讨 论

为了进一步研究乙肝表面抗原 CD40L 治疗性疫苗的疗效, 我们制备了用于小鼠模型的疫苗。小鼠的

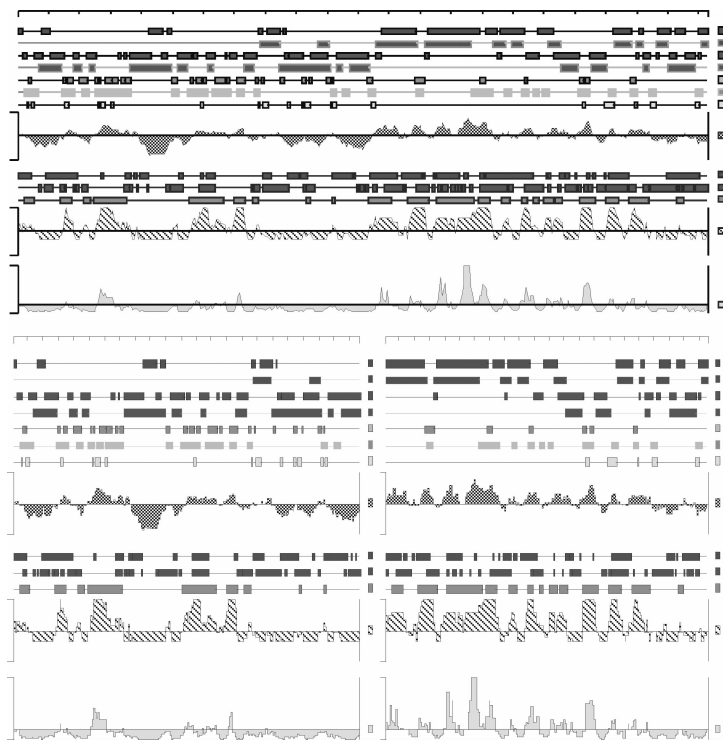


图 2 HBV S - ecdCD40L、HBV S、ecdCD40L 表达蛋白的亲水性、抗原性及表位

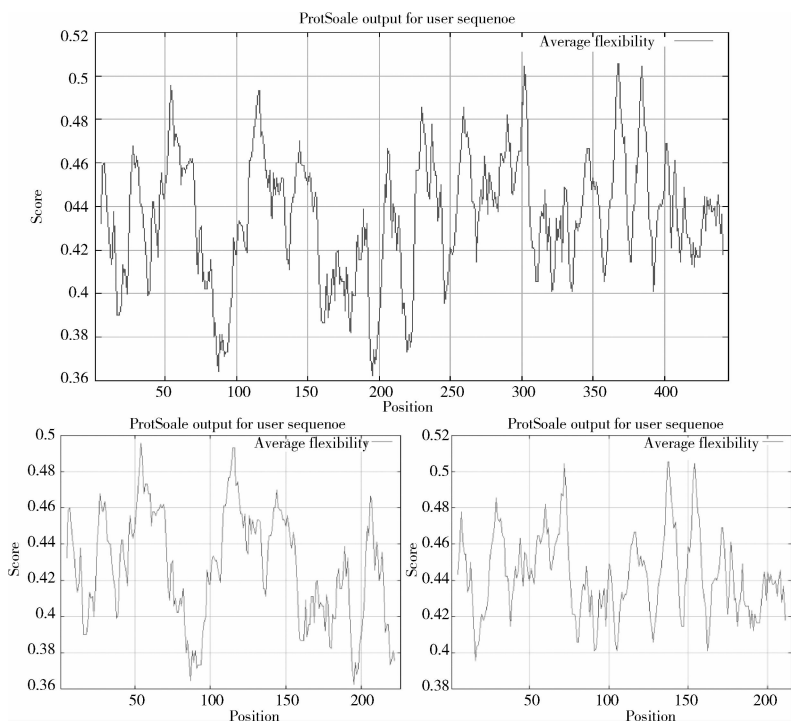


图 3 HBV S - ecdCD40L 融合蛋白柔性分析

CD40L 基因编码的多肽含有 260 个氨基酸,其中胞外段含有 214 个氨基酸,编码该蛋白的基因序列位于 CD40L 基因组第 148 ~ 792 核苷酸与人 CD40L 胞外段基因序列有 83% 的一致性^[4]。CD40L 胞外段包含

了形成具有功能性的 CD40L 三聚体的全部序列。CD4 辅助 T 细胞表面 CD40L 分子的表达是接种疫苗产生的特异性免疫应答的必备条件^[5]。T 辅助细胞在接触外来抗原或疫苗时被激活,CD40L 表达在激

活的 CD4 辅助 T 细胞表面。当 CD40L 接触到 B、T 及树突状细胞表面的 CD40 受体后会增强这些细胞表面分子的表达,从而提高细胞的抗原识别及激活抗原特异性 T 细胞的能力,并且能够刺激树突状细胞的成熟,使其转移到局部淋巴结刺激产生更多的抗原特异性 B 细胞、T 细胞^[6]。在 Tomihara 等^[7]的实验中,他们将 CD40L 基因导入不成熟的树突状细胞中,发现树突状细胞被激活,其抗原递呈功能得到增强。许多研究表明靶相关抗原与 CD40L 胞外段相连接的疫苗能有效激活小鼠体内免疫应答功能,最终达到中和病毒或杀伤肿瘤细胞的目的^[5,6]。

为了使 CD40L 胞外段翻译形成的三聚体结构更加稳定,一般都采用靶基因的片段来代替靶基因的全长与 ecdCD40L 连接。尤其是分子质量大的靶基因,更容易影响 CD40L 胞外段的三聚体结构。此外除了需要考虑片段的大小,还需要考虑片段的抗原性及表位,使之既不影响与之串联基因的表达又能使诱导产生的针对该区域的抗体能够具有中和病毒的能力^[6]。因此我们选择了乙肝表面抗原 S 基因。

乙肝表面抗原由 3 种蛋白组成:包括大蛋白,中蛋白和 S 基因编码的主蛋白。S 基因所编码的主蛋白是乙肝表面包膜的主要成分,也是目前常用乙型肝炎疫苗的主要中和位点。主蛋白表面的亚型决定簇 d/y 和 w/r 组成了乙肝表面抗原的 4 个主要亚型:ayw、adw、adr、ayr。本实验选择了较为常见的 ayw 亚型 HBV S 基因序列作为构成疫苗的靶抗原部分。这也是大多数乙肝转基因小鼠模型携带的乙肝病毒表面抗原类型。

由于 CD40L 与 CD40 接触发挥作用的依赖于同源三聚体结构的维持,因此除了使用靶基因片段来代

替其全长外,我们在靶基因与 ecdCD40L 之间引入一条连接链,从而大大降低靶基因对 CD40L 三聚体结构的干扰。且经过软件对融合蛋白柔性,抗原性,疏水性分析都证实该连接链区域没有影响两侧结构。

经过软件对我们设计构建的小鼠模型重组表达载体 pcDNA3.1-S-ecdCD40L 初步分析可知,该疫苗设计较为合理。表达的融合蛋白生物活性未受明显影响,这为我们以后基因体内实验研究奠定了基础。

参考文献

- 1 European Association for Study of Liver, *et al.* EASL – EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2012, 56(4): 908 – 943
- 2 Grimm D, Heeg M, Thimme R. Hepatitis B virus: from immunobiology to immunotherapy [J]. *Clin Sci (Lond)*. 2013, 124(2): 77 – 85
- 3 Wu JM, Lin XF, Huang ZM, *et al.* Construction of the HBV S – ecdCD40L fusion gene and effects of HBV S – ecdCD40L modification on function of dendritic cells [J]. *J Viral Hepat*, 2011, 18(10): e461 – e467
- 4 Van Kooten C, Banchereau J. CD40 – CD40 ligand [J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 67(1): 2 – 17
- 5 Tang Y, Zhang L, Yuan J, *et al.* Multistep process through which adenoviral vector vaccine overcomes anergy to tumor – associated antigens [J]. *Blood*, 2004, 104(9): 2704 – 2713
- 6 Deisseroth A, Tang Y, Zhang L, *et al.* TAA/ecdCD40L adenoviral prime – protein boost vaccine for cancer and infectious diseases [J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(2): 65 – 69
- 7 Tomihara K, Kato K, Masuta Y, *et al.* Gene transfer of CD40 – ligand to dendritic cells stimulates interferon – gamma production to induce growth arrest and apoptosis of tumor cells [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(3): 203 – 213

(收稿日期:2013 – 07 – 18)

(修回日期:2013 – 07 – 28)

(上接第 18 页)

- 14 Shi X, Elliott RM. Golgi localization of Hantaan virus glycoproteins requires coexpression of G1 and G2 [J]. *Virology*, 2002, 300(1): 31 – 38
- 15 Shi X, Kohl A, Li P, *et al.* Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis [J]. *J Virol*, 2007, 81(18): 10151 – 10160
- 16 Li P, McL Rixon HW, Brown G, *et al.* Functional analysis of the N – linked glycans within the fusion protein of respiratory syncytial virus [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 379: 69 – 83
- 17 Samal S, Khattar SK, Kumar S, *et al.* Coordinate deletion of N – gly-

cans from the heptad repeats of the fusion F protein of Newcastle disease virus yields a hyperfusogenic virus with increased replication, virulence, and immunogenicity [J]. *J Virol*, 2012, 86(5): 2501 – 2511

- 18 Izumi M, Makimura Y, Dedola S, *et al.* Chemical synthesis of intentionally misfolded homogeneous glycoprotein: a unique approach for the study of glycoprotein quality control [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 34(17): 7238 – 7241
- 19 曹海霞,陶泽新,郑晓民,等. 汉坦病毒 GM04 – 38 株包膜糖蛋白上融合肽的初步确定 [J]. *山东大学学报:医学版*, 2009, 47(5): 125 – 130

(收稿日期:2013 – 07 – 03)

(修回日期:2013 – 07 – 11)